

令和 4 年 4 月 11 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09008

研究課題名(和文) もやもや病類縁頭蓋内血管狭窄の網羅的遺伝子解析による発現機序の同定

研究課題名(英文) Identification of expression mechanism by comprehensive gene analysis of Moyamoya disease analogous vascular stenosis

研究代表者

村井 保夫 (Murai, Yasuo)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30287750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：RNF213 c.14576G>A変異は、MMD患者64人(84.2%)とQMMD患者8人(80%)に認められ、変異頻度にコホート間の有意差は認められなかった。RNF213 c.14576G>A変異の有無は、これらの病型の鑑別に有用であることが示唆された。RNF213はICA-AN患者の12.2%、ICS患者の13.6%で検出された。ICA-AN患者とICS患者ではRNF213変異の発現リスクは同等であった(オッズ比、0.884; 95%信頼区間、0.199-3.91; $p=0.871$)。ANの病因と部位をより限定すると、ICA-ANにおけるRNF213変異の発生率は、先行研究よりも高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

QMMDには、血管の異常が基礎疾患に関連している場合と、MMDに無関係の基礎疾患が偶然に合併している場合の2つの形態がある。

本研究の結果は、RNF213 (c.14576G>A) 変異の関与が指摘されている全身性血管疾患に関する今後の研究の基礎となる可能性がある。

RNF213 c.14576G > A変異はICAおよびMCAの先天性異形成とは関連がない可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The RNF213 c.14576G>A mutation was found in 64 patients (84.2%) with MMD and 8 patients (80%) with QMMD; no significant difference in mutation frequency was observed between cohorts. There are two forms of QMMD, one in which the vascular abnormality is associated with an underlying disease, and the other in which MMD is coincidentally complicated by an unrelated underlying disease. It has been suggested that the presence or absence of the RNF213 c.14576G>A mutation may be useful in distinguishing between these disease types.

When the etiology and location of AN were more restricted, the incidence of RNF213 mutations in ICA-AN was higher than that reported in previous studies. Our results suggest that strict maternal vessel selection and pathological selection of AN morphology may reveal an association between genetic mutations and ICA-AN development.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳神経外科 脳血管障害 もやもや病 内頸動脈閉塞症 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

(1) 学術的背景

日本、韓国、中国等のアジア人に多発するもやもや病は、RNF213 遺伝子が、原因遺伝子の一つであることが明らかにされた(Komada et al. J Hum Gene 2011)。現在では日本人のもやもや病患者の 84%がこの遺伝子多型(p.R4859K)を有していると報告されている。一方で、もやもや病類似の血管狭窄を来す疾患や、若年性頭蓋内血管狭窄性病変と、もやもや病との鑑別診断は容易で無い。また、日本人の 2%に本遺伝子を有することが明らかになっており、血管狭窄自体の発現因子が別に存在する可能性が示唆されている。例えば、自己免疫疾患である甲状腺機能異常症では、もやもや病類似の頭蓋内動脈狭窄が知られ、我々はその臨床的特徴検討(文献 10)したことが、着想に至る経緯となった。

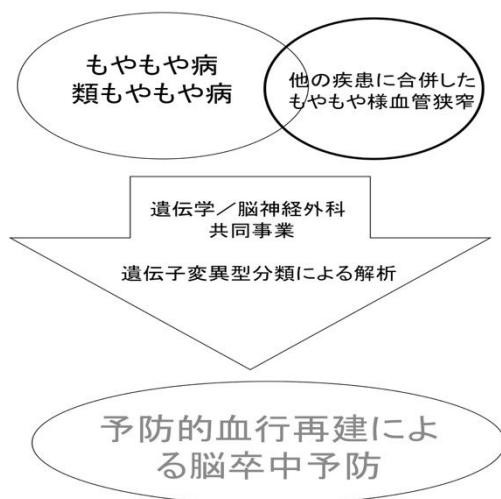
(2) 学術的問い

これら基礎疾患を有する頭蓋内血管狭窄では、その病態解析が立ち遅れており、治療方針の判断指針がないという学術的な「問い」が解決されていない。また、新規難治性疾患克服事業診断基準においても、「動脈硬化が原因と考えられるものと他の原因の頭蓋内内頸動脈終末部の狭窄・閉塞」との間には、明確なボーダーラインを引けない境界領域が存在することから、もやもや病を診断するための、客観的指標の必要性が明らかになり、推進すべき研究課題であると指摘された。

2. 研究の目的

(1)本研究の目的

もやもや病類似血管狭窄性症例と RNF 非発現もやもや病の遺伝子解析と、臨床的特徴を検討することで RNF213 の臨床的意義を解析することと、網羅的遺伝子解析を行うことが本研究の目的である。



2)学術的独自性と創造性

本研究には 2 点の学術的独自性がある。すなわち、もやもや病確診 RNF213 非発現例ともやもや病類似血管病変の RNF213 発現に着目したことと、RNF213 の遺伝子変異をスクリーニング解析系の高感度融解曲線法で確立することである。

本邦での、RNF213 に関する研究でもこのような着眼点のものはない。頭蓋内血管狭窄のうち、非もやもや病の症例研究は他疾患に合併した場合の治療に及ぶものであり波及効果が期待できる創造的な部分である。さらに、本研究で創造性があるのは、RNF213 遺伝子にリスク多型・変異がなかった場合に、さらに次世代シーケンサーや DNA アレイを用いて関連遺伝子群やエクソーム解析により、新規遺伝子の可能性について検討できることである。

3. 研究の方法

(1)対象患者の登録ならびにゲノム DNA 抽出 (村井ならびに脳神経外科連携研究者)

研究対象として、MRA、3 次元 CT 血管撮影、脳血管撮影で頭蓋内内動脈系狭窄性所見を日本医科大学病院で確認された罹患者とした。臨床情報(原発疾患、発症年齢、身体所見、画像評価、検査所見等)リストを作成し、該当患者の登録を行う。比較するコントロール集団として既知内頸動脈瘤の患者を対象とする。説明文書を用い同意を得、血液(術前検査採血時に同時に本研究用に 5 ml 採血)を検体とする。検体を連結可能匿名化し、ゲノム DNA を抽出する。

(2)RNF213 遺伝子解析

頻度の高い RNF213 遺伝子の p.R4859K を来す遺伝子多型(c.14576G>A)について、多人数を迅速に遺伝子多型の分類ができるよう高感度融解曲線法を基盤とした解析系を構築する。続いて、RNF213 は 5,256 アミノ酸、69 エクソンからなる巨大遺伝子であり、RNF213 遺伝子 69 エクソン全体で遺伝子変異をスクリーニングできる解析系を高感度融解曲線法を基盤とし開発する。遺伝子多型解析でリスク型(GA, AA)でない方に対しては、RNF213 遺伝子全体エクソンでの遺伝子解析を行った。

4. 研究成果

(1) 類もやもや病ともやもや病の定義における RNF213 多型の役割

類もやもや病(QMMD)は、もやもや病(MMD)にさらに基礎疾患を併発したものである。ring finger protein 213 (RNF213) c.14576G>A 変異はアジア人集団において MMD と高い相関があるが、QMMD との関連は不明である。そこで、本研究で著者らは、QMMD の遺伝子診断と分類における RNF213 c.14576G>A 変異について検討した。MMD 患者 76 名と QMMD 患者 10 名を対象に、RNF213 c.14576G>A の有病率を調査した。両群間に年齢、性別、家族歴、発症様式に有意差はなかった。QMMD の基礎疾患は、甲状腺機能亢進症 (n=6)、神経線維腫症 1 型 (n=2)、シェーグレン症候群 (n=1) および髄膜炎 (n=1) であった。RNF213 c.14576G>A 変異は、MMD 患者 64 人 (84.2%) と QMMD 患者 8 人 (80%) に認められ、変異頻度にコホート間の有意差は認められなかった。QMMD には、血管の異常が基礎疾患に関連している場合と、MMD に無関係の基礎疾患が偶然に合併している場合の 2 つの形態がある。RNF213 c.14576G>A 変異の有無は、これらの病型の鑑別に有用であることが示唆された。

Ishisaka E, Watanabe A, Murai Y, Shirokane K, Matano F, Tsukiyama A, Baba E, Nakagawa S, Tamaki T, Mizunari T, Tanikawa R, Morita A. Role of RNF213 polymorphism in defining quasi-moyamoya disease and definitive moyamoya disease. *Neurosurg Focus*. 2021 Sep;51(3):E2. doi: 10.3171/2021.5.FOCUS21182. PMID: 34469872

(2) RNF213 c.14576G>A は頭蓋内内頸動脈嚢状動脈瘤と関連する可能性

もやもや病の関連遺伝子である RNF213 の変異 (c.14576G>A) は、末端の内頸動脈 (ICA) 狭窄 (15%以上) (ICS) に関与していることが知られている。RNF213 と脳動脈瘤 (AN) に関する研究は、発生部位や形態に着目しておらず、両者の関係を明らかにすることはできなかった。しかし、フランス系カナダ人において、RNF213 と AN との関係を示唆する報告があった。このため、本研究では ICA 嚢状動脈瘤 (ICA-AN) と RNF213 の関係について検討した。ICA-AN とアテローム性 ICS を持つ被験者の RNF213 の発現を解析した。

	ICA	Aneurysm	Stenosis
RNF213+ (%)		12.2	13.6
Male (%)		22.4	59
Mean Age		62.1	62.5
HT (%)		57.1	91
DM (%)		10.3	40.9
DL (%)		40.8	63.6

もやもや病の家族歴のある症例は除外した。4mm 以下の AN は、手術または血管造影所見によってのみ AN と診断した。RNF213 は ICA-AN 患者の 12.2%、ICS 患者の 13.6% で検出された。ICA-AN 患者と ICS 患者では RNF213 変異の発現リスクは同等であった (オッズ比、0.884; 95% 信頼区間、0.199-3.91; p=0.871)。ICA-AN と RNF213 (c.14576G>A) の関係は、ICA や分岐部の位置、破裂の有無、多発性とは相関がなかった。AN の病因と部位をより限定すると、ICA-AN における RNF213 変異の発生率は、先行研究で報告されたものよりも高かった。我々の結果は、母血管の分類と AN 形態の病理学的選択により、遺伝子変異と ICA-AN 発生との関連性が明らかになる可能性を示唆している。本研究の結果は、RNF213 (c.14576G>A) 変異の関与が指摘されている全身性血管疾患に関する今後の研究の基礎となる可能性がある。

Murai Y, Ishisaka E, Watanabe A, Sekine T, Shirokane K, Matano F, Nakae R, Tamaki T, Koketsu K, Morita A. RNF213 c.14576G>A Is Associated with Intracranial Internal Carotid Artery Saccular Aneurysms. *Genes (Basel)*. 2021 Sep 23;12(10):1468. doi: 10.3390/genes12101468. PMID: 34680863

(3) Ring finger protein 213 c.14576G>A 変異は内頸動脈および中大脳動脈形成不全に関与しない

ring finger protein 213 (RNF213) 感受性遺伝子は、日本人および韓国人の両側内頸動脈 (ICA) 閉塞性疾患であるもやもや病 (MMD) 患者の 80% 以上で検出された。さらに、RNF213 は、動脈硬化性 ICA 狭窄を有する東アジア人の 20% 以上に検出された。本研究では、ICA 系の先天性閉塞性病変における RNF213 変異の頻度を評価した。MMD、類 MMD、または類 MMD 関連疾患の家族歴を有する患者は除外した。ICA または中大脳動脈 (MCA) の血管新生異常を 10 例で診断した。神経線維腫症の患者は除外した。最終的に、先天性血管異常の 9 名が選ばれ、そのうち 5 名は ICA 欠損、4 名は twig-like MCA を有していた。RNF213 c.14576G > A の突然変異はすべての患者に見

られなかった。したがって、RNF213 c.14576G > A 変異は ICA および MCA の先天性異形成とは関連がない可能性がある。本研究の結果は、先天性血管疾患と MMD の鑑別に役立つと思われる。Murai Y, Ishisaka E, Watanabe A, Sekine T, Shirokane K, Matano F, Nakae R, Tamaki T, Koketsu K, Morita A. Ring finger protein 213 c.14576G>A mutation is not involved in internal carotid artery and middle cerebral artery dysplasia. *Sci Rep.* 2021 Nov 12;11(1):22163. doi: 10.1038/s41598-021-01623-6. PMID: 34773068

(4)多発性内分泌腫瘍 2A 型に合併したもやもや症候群の意義

もやもや症候群を合併した MEN2A の遺伝子解析をおこなった。磁気共鳴血管撮影 (MRA) で両側の内頸動脈の鎖骨上狭窄と大脳基底核の周囲に異常なもやもや様血管を認めたが、もやもや病の感受性遺伝子である RNF213 のヘテロ接合型であった。甲状腺髄様癌 (MTC), 左側褐色細胞腫 (PHEO) と診断されている。遺伝子検査により, Ret 遺伝子のエクソン 11 のコドン 634 の変異 (TGC-TTC 変異; p.Cys634Phe) に対するヘテロ接合性が明らかになった。頭蓋内血管狭窄は、RNF213 の遺伝子変異と MEN2A によるカテコールアミンの過剰分泌によって引き起こされた可能性がある。

Matano F, Murai Y, Watanabe A, Shirokane K, Igarashi T, Shimizu K, Shimada T, Morita A. A Case of Moyamoya Syndrome Associated With Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021 Nov 11;12:703410. doi: 10.3389/fendo.2021.703410. eCollection 2021. PMID: 34858321

研究成果 (英文)

RNF213 c.14576G>A Is Associated with Intracranial Internal Carotid Artery Saccular Aneurysms.

A mutation in RNF213 (c.14576G>A), a gene associated with moyamoya disease (>80%), plays a role in terminal internal carotid artery (ICA) stenosis (>15%) (ICS). Studies on RNF213 and cerebral aneurysms (AN), which did not focus on the site of origin or morphology, could not elucidate the relationship between the two. However, a report suggested a relationship between RNF213 and AN in French-Canadians. Here, we investigated the relationship between ICA saccular aneurysm (ICA-AN) and RNF213. We analyzed RNF213 expression in subjects with ICA-AN and atherosclerotic ICS. Cases with a family history of moyamoya disease were excluded. AN smaller than 4 mm were confirmed as AN only by surgical or angiographic findings. RNF213 was detected in 12.2% of patients with ICA-AN and 13.6% of patients with ICS; patients with ICA-AN and ICS had a similar risk of RNF213 mutation expression (odds ratio, 0.884; 95% confidence interval, 0.199-3.91; p = 0.871). The relationship between ICA-AN and RNF213 (c.14576G>A) was not correlated with the location of the ICA and bifurcation, presence of rupture, or multiplicity. When the etiology and location of AN were more restricted, the incidence of RNF213 mutations in ICA-AN was higher than that reported in previous studies. Our results suggest that strict maternal vessel selection and pathological selection of AN morphology may reveal an association between genetic mutations and ICA-AN development. The results of this study may form a basis for further research on systemic vascular diseases, in which the RNF213 (c.14576G>A) mutation has been implicated.

Ring finger protein 213 c.14576G>A mutation is not involved in internal carotid artery and middle cerebral artery dysplasia.

The ring finger protein 213 (RNF213) susceptibility gene has been detected in more than 80% of Japanese and Korean patients with moyamoya disease (MMD), a bilateral internal carotid artery (ICA) occlusion. Furthermore, RNF213 has been detected in more than 20% of East Asians with atherosclerotic ICA stenosis. In this study, we evaluated the frequency of RNF213 mutations in congenital occlusive lesions of the ICA system. This case series was conducted jointly at four university hospitals. Patients with a family history of MMD, quasi-MMD, or related diseases were excluded. Ten patients were diagnosed with abnormal ICA or middle cerebral artery (MCA) angiogenesis. Patients with neurofibromatosis were excluded. Finally, nine patients with congenital vascular abnormalities were selected; of these, five had ICA deficiency and four had twig-like

MCA. The RNF213 c.14576G > A mutation was absent in all patients. Therefore, the RNF213 c.14576G > A mutation may not be associated with ICA and MCA congenital dysplasia-rare vascular anomalies making it difficult to study a large number of cases. However, an accumulation of cases is required for accurate determination. The results of this study may help differentiate congenital vascular diseases from MMD.

Moyamoya Syndrome Associated With Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A.

To the best of our knowledge, we report a case of MEN2A complicated by moyamoya syndrome. A 52-year-old woman presented with vertigo. Magnetic resonance angiography (MRA) revealed bilateral supraclinoid stenosis of the internal carotid artery and abnormal moyamoya-like vessels around the basal ganglia. She had a heterozygous variant of RNF213, which is the susceptibility gene for moyamoya disease. She had also previously received diagnoses of medullary thyroid carcinoma (MTC) at age 23 and left-sided pheochromocytoma (PHEO) at age 41. Genetic testing revealed heterozygosity for a mutation at codon 634 in exon 11 (TGC-TTC mutation; p.Cys634Phe) of the Ret gene. Intracranial vascular stenosis may have been caused by a genetic mutation of RNF213 and hypersecretion of catecholamines by MEN2A. Physicians should recognize that MEN2A can be present with moyamoya syndrome.

Role of RNF213 polymorphism in defining quasi-moyamoya disease and definitive moyamoya disease.

OBJECTIVE: Quasi-moyamoya disease (QMMD) is moyamoya disease (MMD) associated with additional underlying diseases. Although the ring finger protein 213 (RNF213) c.14576G>A mutation is highly correlated with MMD in the Asian population, its relationship to QMMD is unclear. Therefore, in this study the authors sought to investigate the RNF213 c.14576G>A mutation in the genetic diagnosis and classification of QMMD. **METHODS:** This case-control study was conducted among four core hospitals. A screening system for the RNF213 c.14576G>A mutation based on high-resolution melting curve analysis was designed. The prevalence of RNF213 c.14576G>A was investigated in 76 patients with MMD and 10 patients with QMMD. **RESULTS:** There were no significant differences in age, sex, family history, and mode of onset between the two groups. Underlying diseases presenting in patients with QMMD were hyperthyroidism (n = 6), neurofibromatosis type 1 (n = 2), Sjögren's syndrome (n = 1), and meningitis (n = 1). The RNF213 c.14576G>A mutation was found in 64 patients (84.2%) with MMD and 8 patients (80%) with QMMD; no significant difference in mutation frequency was observed between cohorts. **CONCLUSIONS:** There are two forms of QMMD, one in which the vascular abnormality is associated with an underlying disease, and the other in which MMD is coincidentally complicated by an unrelated underlying disease. It has been suggested that the presence or absence of the RNF213 c.14576G>A mutation may be useful in distinguishing between these disease types.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Murai Y, Ishisaka E, Watanabe A, Sekine T, Shirokane K, Matano F, Nakae R, Tamaki T, Koketsu K, Morita A.	4. 巻 12
2. 論文標題 RNF213 c.14576G>A Is Associated with Intracranial Internal Carotid Artery Saccular Aneurysms.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes (Basel).	6. 最初と最後の頁 1468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes12101468	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Murai Y, Ishisaka E, Watanabe A, Sekine T, Shirokane K, Matano F, Nakae R, Tamaki T, Koketsu K, Morita A.	4. 巻 11
2. 論文標題 Ring finger protein 213 c.14576G>A mutation is not involved in internal carotid artery and middle cerebral artery dysplasia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 22163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-01623-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matano F, Murai Y, Watanabe A, Shirokane K, Igarashi T, Shimizu K, Shimada T, Morita A.	4. 巻 12
2. 論文標題 A Case of Moyamoya Syndrome Associated With Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Endocrinol (Lausanne).	6. 最初と最後の頁 703410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2021.703410. eCollection 2021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishisaka E, Watanabe A, Murai Y, Shirokane K, Matano F, Tsukiyama A, Baba E, Nakagawa S, Tamaki T, Mizunari T, Tanikawa R, Morita A.	4. 巻 51
2. 論文標題 Role of RNF213 polymorphism in defining quasi-moyamoya disease and definitive moyamoya disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurosurg Focus.	6. 最初と最後の頁 E2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2021.5.FOCUS21182.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 尾関友博1、村井保夫1、石坂栄太郎2、関根鉄朗3、 白銀一貴1、亦野文宏1、中江竜太4、瀬織健太5、 玉置智規6、水成隆之5、森田明夫1
2. 発表標題 内頸動脈および中大脳動脈形成異常とRNF213 変異の関係
3. 学会等名 stroke 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村井保夫1,石坂栄太郎2,渡邊 淳3,4,白銀一貴5,亦野文宏1,瀬織健太6,玉置智規5,水成隆之6,森田明夫1
2. 発表標題 もやもや病関連遺伝子変異 RNF213 (c.14576G>A) の頭蓋内内頸動脈囊状動脈瘤における検討
3. 学会等名 日本医科大学医学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	渡邊 淳 (Watanabe Atsushi) (10307952)	金沢大学・附属病院・特任教授 (13301)	
研究分担者	亦野 文宏 (Fumihiro Matano) (70557511)	日本医科大学・医学部・助教 (32666)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------